

**Государственное бюджетное общеобразовательное учреждение  
города Москвы «Школа № 1517»**

**Продуцирование антибиотиков  
почвенными актиномицетами на твердых средах**

**Автор:**

Штань Ярослава Дмитриевна,

10 класс:

**Руководитель:**

Белоусов Андрей Александрович

**Москва, 2025 г.**

## **Оглавление**

I. Введение.....	3
II. Обзор литературы.....	4
III. Материалы и методы.....	7
Результаты и обсуждения .....	12
Выводы .....	22
Заключение.....	22
Литература.....	23
Приложение 1.....	24
Приложение 2.....	25
Приложение 3.....	26

## I. Введение

Актиномицеты известны как микроорганизмы, способные вырабатывать широкий спектр биологически активных вторичных метаболитов, имеющих большое значение для медицины, сельского хозяйства, микробиологической промышленности и других отраслей народного хозяйства. Более 90% антимикробных препаратов, используемых в медицине, выделены из актиномицетов [Nanaki et al., 2005]. Кроме того, актиномицеты являются продуцентами витаминов, стимуляторов роста, токсинов, гормонов и других веществ, представляющих интерес для человека.

Помимо широкого спектра возможностей практического применения актиномицетов, они представляют собой интерес для фундаментальной науки как микроорганизмы, обладающие набором признаков, присущих многоклеточным организмам, и расширяющих, таким образом, представления об эволюции прокариот в сторону многоклеточности [1].

С каждым годом увеличивается число устойчивых к традиционным антибиотикам патогенных штаммов микроорганизмов. По данным Global Burden of Disease (GBD) study к 2050 г. смертность от резистентных к антибиотикам патогенов составит 10 млн в год [[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1) published September 16, 2024]. Возникновение устойчивости к антибиотикам является практически неотвратимым следствием их использования. Изучение механизмов возникновения и распространения резистентности к антибиотикам у микроорганизмов, обитающих в естественной среде, в последние 20 лет сформировало новые представления об этой проблеме. В частности, найдены гены устойчивости, неизвестные ранее для клинических патогенных бактерий [2]. Актиномицеты как продуценты широкого спектра антибиотиков представляют собой особый интерес для данной темы.

Одновременно продолжается поиск новых молекул с антибактериальной активностью. Ежегодно в различных институтах и лабораториях ученые выделяют тысячи культур актиномицетов, среди которых есть неизвестные ранее виды и штаммы – продуценты антибиотиков.

В данной работе под термином «продуцирование антибиотиков» имеется ввиду антагонистическая активность метаболитов штаммов актиномицетов по отношению к тестовым штаммам микроорганизмов. Согласно данным литературы, эта активность у актиномицетов чаще всего обусловлена выделением антибиотиков для подавления роста конкурентных микроорганизмов, но может быть связана и с иным действием отдельного метаболита или их комплекса.

В настоящей работе исследовано продуцирование антибиотиков 28-ю штаммами актиномицетов, выделенных из почвенных образцов Красногорского и Талдомского районов Московской области, на о. Крит (Греция) при их культивировании на 7-ми различных твердых средах. Работа выполнена в г. Москве в 2025 г., продолжительность исследования 12 месяцев.

**Актуальность.** Каждый год выделяются тысячи новых штаммов актиномицетов. Первичная оценка перспективности этих штаммов с точки зрения получения новых антибиотиков представляется чрезвычайно актуальной задачей. В решении этой задачи может помочь использование набора стандартных сред.

**Гипотеза:** На продуцирование антибиотиков актиномицетами влияет состав среды, на которой производится культивирование.

### **Цель работы**

Изучение продуцирования антибиотиков 28-ю штаммами актиномицетов на твердых средах.

### **Задачи работы**

- Выбор видов тестовых микроорганизмов, получение чистых культур и видовая идентификация.
- Выделение актиномицетов из образцов почвы и получение чистых культур.
- Выбор сред культивирования выделенных актиномицетов и метода оценки результатов воздействия вторичных метаболитов выделенных штаммов актиномицетов на культуры *Bacillus subtilis*, *Kocuria varians*, *Escherichia coli*.
- Проверка продуцирования антибиотиков выделенными штаммами актиномицетов.

## **II. Обзор литературы**

Актиномицеты представляют собой обширную группу бактерий, основным отличием которых от остальных прокариот является их способность образовывать мицелий, состоящий из длинных нитевидных гиф с истинным ветвлением.

В современной систематике актиномицеты относятся к прокариотным микроорганизмам: царство *Bacteria*, отдел *Actinobacteria*, класс *Actinobacteria*, подкласс *Actinobacteridae*, порядок *Actinomycetales*, включающий 30 семейств, более 100 родов, 700 видов (Stackebrandt et al., 1997) [3]. Актиномицеты имеют грамположительный тип строения и химического состава клеточных стенок, высокое содержание ГЦ-пар оснований в ДНК. При окрашивании по Граму клетки окрашиваются неравномерно, отдельные участки не прокрашиваются. В старых культурах клетки окрашиваются грамвариабельно, а на отдельных стадиях развития грамтрицательно. По типу дыхания актиномицеты, в основном, являются аэробами, но существуют также факультативно анаэробные и облигатно анаэробные виды. Актиномицеты кислотоустойчивы, большинство видов являются нейтрофильными [4].

Тело актиномицетов образовано ветвящимися гифами, сплетающимися в массу мицелия. Толщина гиф актиномицетов варьирует в очень широком диапазоне. Самые тонкие гифы могут иметь толщину 0,05 – 0,1 мкм и невидимы в световом микроскопе. Самые толстые гифы могут достигать в диаметре 2 мкм и сопоставимы

с тонкими гифами грибов. В среднем, толщина гиф составляет 0,3-0,8 мкм. Толщина гиф может изменяться в десятки раз и зависит не только от видовой принадлежности штамма, но и от возраста культуры и условий развития. Гифы актиномицетов растут в длину как своими концевыми участками, так и внутренними районами и на определенных этапах развития не имеют клеточных перегородок [5,6].

У большинства видов актиномицетов по мере роста и развития происходит дифференцировка мицелия на субстратный, поверхностный и воздушный, которая наиболее заметна при развитии колонии на твердых субстратах. Воздушный мицелий развивается на поверхности колоний в виде пушистого, бархатного, мучнистого налета или в виде корочки различных цветов. Жизненный цикл таких актиномицетов делится на несколько фаз и зависит от условий, в которых развивается колония. Наиболее сложным жизненным циклом обладают представители семейства *Streptomycetaceae*, являющиеся на сегодняшний день хорошо изученными. Образование колонии начинается с прорастания споры одной или несколькими трубками прорастания, которые затем удлиняются в одном направлении (апикальный рост) с последующим ветвлением. Быстро растущие молодые гифы образуют более или менее разветвленную и плотную сеть субстратного мицелия. На следующей фазе развития рост гиф субстратного мицелия замедляется, часть гиф погибает, начинается образование воздушного мицелия. Формирование воздушного мицелия – это сложный многоступенчатый процесс, в ходе которого происходит дифференцировка гиф на вегетативные и спорообразующие, завершающийся гибелью части гиф воздушного мицелия и образованием клеточных перегородок по длине спорообразующих воздушных гиф с дальнейшим их распадом на споры [1,5,6].

Описанный выше процесс развития колоний стрептомицетов является результатом реализации сложной программы, включающей скоординированные события морфологической и физиологической дифференциации гиф, межклеточные коммуникации и программируемую клеточную смерть. Несмотря на то, что о программируемой клеточной смерти актиномицетов имеется мало сведений, на сегодняшний день различными авторами события программируемой клеточной смерти рассматриваются как наиболее надежный показатель готовности культуры к образованию вторичных метаболитов, а исследования в этой области востребованы биотехнологической промышленностью [7].

Еще одной отличительной особенностью актиномицетов является их большая изменчивость. Даже незначительные отклонения в составе питательной среды или других внешних факторов вызывают изменения в росте, развитии и биохимической деятельности культуры. Варианты, получаемые от одного и того же вида, могут быть многочисленны и различаться по морфологическим, культуральным и физиологическим признакам. Например, пигментированные культуры могут образовывать бесцветные варианты или варианты различных цветов. Нередко наблюдается потеря способности образовывать воздушный мицелий. При

изменении биохимической деятельности культуры могут происходить изменения в продуцировании антибиотиков [5,6].

Актиномицеты - гетеротрофы (хемоорганотрофы), и, хотя потребность в питательных веществах различна для разных видов актиномицетов, большинство не требовательны к питательным средам и могут расти даже на голодном агаре. На развитие колоний актиномицетов значительное влияние оказывают источники азота и углерода, а также макро- и микроэлементы, содержащиеся в среде или субстрате. Так, например, исследования продуцирования антибиотиков актиномицетом *Actinomyces rimosus* 8229 (по современной классификации *Streptomyces rimosus*) показали, что при культивировании на среде с кукурузным экстрактом, когда в качестве источника азота используется хлористый или сернокислый аммоний, через 60 часов происходит образование значительной массы гиф с подавленным спорообразованием, которые обладают высокой способностью к продуцированию антибиотика. Замена источника азота на азотнокислый натрий приводит к изменению характера развития культуры. В частности, не образуется гиф с подавленным спорообразованием, что, в свою очередь, приводит к резкому снижению продуцирования антибиотика. В опытах с тем же штаммом с использованием в качестве источника углерода крахмала или крахмала с добавлением глюкозы показали повышение способности культуры к продуцированию антибиотиков при добавлении глюкозы. Хорошо изучено значение неорганического фосфора для биосинтеза антибиотиков. [6].

Актиномицеты широко распространены практически на всех природных субстратах – воздухе, воде и почве, их присутствие также обнаружено на растительных и животных тканях, включая человека, но наибольшее их количество встречается в почве [3]. Актиномицеты служат неотъемлемой частью микробного комплекса почвы, составляя четвертую часть бактерий, вырастающих на питательных средах при посевах из почвенных суспензий. На видовой и количественный состав актиномицетов в почве влияет ее тип, доступность кислорода, кислотность, влажность, температура, доступность питательных веществ, различные биологические факторы, в том числе, конкурентоспособность и симбиотические отношения [4].

Одной из проблем при выделении актиномицетов из почвенных образцов является их медленный рост по сравнению с другими бактериями и грибами, присутствующими в почвенных образцах. При посевах поверхность среды полностью или почти полностью покрывается колониями сопутствующих микроорганизмов, а колонии актиномицетов малочисленны и практически неотделимы для получения чистой культуры. Решением этой проблемы может быть как выбор правильного момента времени для сбора почвенных образцов, так и предварительная обработка образцов почвы перед высевом на питательные среды.

Сбор образцов почвы в периоды, когда в почве содержится много органических разлагающихся остатков, а сама почва максимально сухая, повышает количество выделяемых актиномицетов [5]. Предварительная обработка почвенных образцов перед приготовлением суспензий или воздействие на готовые суспензии

различными физическими, химическими или селективными методами также позволяет повысить количество выделяемых видов актиномицетов. Так, например, предварительная обработка почвенных суспензий соком алоэ в различных концентрациях в течение 1 часа приводит не только к увеличению количества выросших на питательной среде актиномицетов, но и возрастанию доли колоний редких родов [8].

### III. Материалы и методы

Материалы и оборудование для микроскопии:

- Микроскоп *Levenhuk* с увеличением 40, 100, 1 000 крат (Oil);
- Камера для микроскопа цифровая *Levenhuk M500 BASE* (разрешение 2592x1944);
- Масло иммерсионное;
- Генциановый фиолетовый карболовый;
- Раствор Люголя;
- Раствор сафранина;

Оборудование прочее:

- Центрифуга лабораторная *LC-04B Армед*;
- Инкубатор для яиц;
- Шейкер лабораторный *SK-20*;
- Весы ювелирные  $d = 0,001$  г
- РН-метр *EcoDigital*.

Среды и компоненты сред:

- Среда индукционная на основе бульона *LB* с добавлением лактозы и глюкозы;
- Стафилококкагар;
- Агар Эндо-ГРМ;
- Агар Сабуро с хлорамфениколом;
- Среда Гисса-ГРМ с сахарозой;
- Среда Гисса-ГРМ с глюкозой;
- Среда АГВ для определения чувствительности к антибиотикам;
- Мясо-пептонный бульон;
- Бульон Хоттингера;
- Глицерин;
- Пептон;
- Дрожжевой экстракт;
- Овсяные хлопья;
- Глюкоза;
- Натрий азотно-кислый;
- Калий азотно-кислый;
- Дигидрофосфат калия;
- Сульфат магния;
- Хлорид калия;
- Сульфат железа;
- Цитрат железа;

- Хлорид натрия;
  - Агар микробиологический;
  - Плазма кроличья цитратная сухая;
  - Вода дистиллированная;
  - Пробирки с транспортной средой Стюарта с тампоном-зондом стерильным.
- Реагенты и материалы диагностические:
- Перекись водорода;
  - Раствор натрия хлорида 0,9%;
  - Диски с антибиотиками: ампициллин, бацитрацин, новобиоцин;
  - Диски с антимикотиками: нистатин;
  - ОКСИ-тест (полоски и реактив) Лахема;
  - Стандарт мутности МакФарланда 0,5;
  - Споробактерин жидкий – суспензия биомассы живых бактерий *Bacillus subtilis* 534. В одном мл содержится не менее  $1 \cdot 10^9$  КОЕ;
  - Колибактерин – лиофилизат биомассы живых бактерий *Escherichia coli* M-17. Одна доза содержит не менее  $10 \cdot 10^9$  КОЕ.
  - Сок листьев алоэ древовидного, Вифитех.

Лабораторные вспомогательные материалы:

- Горелка;
- Чашки Петри 60x18 мм;
- Пробирки стеклянные с резиновыми конусообразными крышками;
- Пробирки центрифужные 15 мл;
- Пробирки Эппендорфа 5 мл;
- Колбы лабораторные;
- Цилиндры лабораторные мерные;
- Пипетки стерильные;
- Бактериологические петли;
- Шпатели стеклянные;
- Стерильные палочки-тампоны ватные;
- Пинцеты;
- Салфетки медицинские спиртовые;
- Пакеты бумажные для стерилизации.

### Методика исследования

Для проверки продуцирования антибиотиков выделенными штаммами актиномицетов использован метод воздействия вторичными метаболитами, содержащимися в среде культивирования, на тестовые микроорганизмы. В случае подавления или задержки роста тестовых микроорганизмов можно утверждать, что вторичные метаболиты штамма содержат антибиотики (вещества, подавляющие рост других микроорганизмов).

В качестве тестовых микроорганизмов были использованы:

- *Bacillus subtilis* - свободноживущая, непатогенная грамположительная палочка, образующая эндоспоры, факультативный анаэроб. Является одним из самых изученных видов бактерий. Является продуцентом нескольких антибиотиков и биологически активных веществ. Широко используется в фармакологии, сельском хозяйстве, ветеринарии и других областях. Является безопасной для человека.

Систематика: род *Bacillus*, семейство *Bacillaceae*, порядок *Bacillales*, класс *Bacilli*, тип *Firmicutes*, <группы без ранга> *Terrabacteria group*, царство Бактерии.

- *Kocuria varians* (старое название *Micrococcus varians*) – неподвижные грамположительные кокки, облигатные аэробы, широко распространенные в почве, воздухе, воде. *Kocuria varians* является частью нормальной микробиоты кожи человека и млекопитающих. У человека может колонизировать полость рта, слизистые оболочки, ротоглотку и верхние дыхательные пути. Как правило, не представляет опасность для человека со здоровой иммунной системой. У людей с нарушенным иммунитетом может являться причиной оппортунистических инфекций.

Систематика: Род *Kocuria*, семейство *Micrococcaceae*, порядок *Micrococcales*, класс *Actinobacteria*, тип *Actinobacteria*, царство Бактерии.

*Escherichia coli* – вид грамотрицательных палочковидных бактерий, факультативных анаэробов, широко распространенных в нижней части кишечника теплокровных животных. Способность выживать в окружающей среде делает *Escherichia coli* широко распространенным микроорганизмом. Большинство штаммов являются безвредными для организма хозяина, но некоторые могут вызывать тяжелые пищевые отравления (наиболее известный патогенный серотип O157:H7). Является одной из самых изученных бактерий и играет важную роль в современной промышленной микробиологии и биологической инженерии. В частности, она считается универсальным микроорганизмом для синтеза чужеродных белков.

Систематика: Род *Escherichia*, семейство *Enterobacteriaceae*, порядок *Enterobacteriales*, класс *Gamma Proteobacteria*, тип *Proteobacteria*, царство Бактерии.

*Bacillus subtilis* 534 получена из препарата Споробактерин, *Escherichia coli* M-17 из препарата Колибактерин, являющимися безрецептурными лекарственными препаратами. Для получения чистой культуры *Bacillus subtilis* 534 0,05 мл препарата Споробактерин вносился в 10 мл стерильного физраствора с последующим посевом на агаризованный LB бульон. Для получения чистой культуры *Escherichia coli* M-17 содержимое 1-го флакона препарата Колибактерин заливалось 100 мл стерильного физраствора с последующим посевом на среду Эндо. Посевы инкубировались при температуре 37°C в течение 24 часов.

Для получения культуры *Kocuria varians* был проведен смыв микрофлоры с сухого участка кожи (шея), не имеющего внешних признаков патологий, с его последующим посевом на агаризованный LB бульон и инкубацией при температуре 37°C в течение 24 часов. Чистая культура выделенного микроорганизма была

получена с помощью пересева изолированной колонии, имеющей желтую пигментацию, на агаризованный LB бульон методом исчезающего штриха и последующей инкубацией посева при температуре 37°C в течение 24 часов. Для видовой идентификации чистой культуры полученного микроорганизма была проведена микроскопия окрашенного по Граму препарата и биохимические тесты, проведенные в таблице 1.

Таблица 1. Методы проведения тестов

Тест	Результат
Тест на каталазу	Воздействие на колонию перекисью водорода. Положительный результат теста в случае появления пузырьков газа на поверхности колонии.
Тест на галотолерантность в присутствии 7% NaCl	Посев на стафилококк агар. Положительный результат в случае роста колоний при инкубировании в течение 24-х часов при температуре 37°C.
Тест на оксидазу	Нанесение колонии на тестовую полоску, пропитанную реактивом. Положительный результат в случае изменения цвета полоски на синий.
Тест на коагулазу	Колония засеивается в пробирку с 0,5 мл кроличьей плазмы с последующей инкубацией при температуре 37°C в течение 24 часов. При положительном результате в пробирке образуется желе или сгусток. Контроль образования сгустка проводят через 4 часа, если сгусток отсутствует, то через 24 часа.
Тест на ферментацию сахарозы	Посев на скошенный агар среды Гисса с сахарозой. Положительный результат в случае изменения цвета среды с синего на желтый после инкубирования в течение 24 часов при температуре 37°C.
Тест на ферментацию глюкозы	Посев на скошенный агар среды Гисса с глюкозой. Положительный результат в случае изменения цвета среды с синего на желтый после инкубирования в течение 24 часов при температуре 37°C.
Тест на чувствительность к новобиоцину	Посев методом газона на среду АГВ с помещением в центр чашки Петри диска с новобиоцином. При положительном результате вокруг диска с новобиоцином образуется зона подавления роста микроорганизма.
Тест на чувствительность к бацитрацину	Посев методом газона на среду АГВ с помещением в центр чашки Петри диска с новобиоцином. При положительном результате вокруг диска с новобиоцином образуется зона подавления роста микроорганизма.

Для выделения актиномицетов был проведен забор 15 образцов почвы в Красногорском и Талдомском районах г. Москвы, на о. Крит в феврале-августе 2025

г. Образцы выдерживались в морозильной камере при температуре  $-15^{\circ}\text{C}$  в течение 3-х недель. После этого образцы почвы размораживались при комнатной температуре. 1 г земли из каждого образца освобождался от посторонних включений, перетирался в керамической ступке и вносился асептически в пробирку с 10 мл дистиллированной воды. Пробирки встряхивались на лабораторном шейкере в течение 20 минут на скорости 200 об/мин и затем выдерживались в течение 10 минут для осаждения земли. 1 мл полученной взвеси вносился в пробирку с 9 мл 50% раствора сока алоэ и дистиллированной воды и выдерживался в течение 1 часа. Затем пробирки прокручивались в центрифуге на скорости 2 500 оборотов в минуту в течение 20 минут.

Из каждой пробирки проводился посев в 6 чашек Петри на среду Гаузе 1 методом газона. Посев газонным методом проводился путем нанесения на поверхность застывшей среды 0,05 мл полученной суспензии, которая равномерно распределялась по всей поверхности среды с помощью стеклянного шпателя. Чашки инкубировались в закрытом контейнере при температуре  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  в течение 14 дней.

Через 14 дней проводилась визуальная оценка полученных колоний для выделения в чистую культуру. При оценке учитывалась возможность выделения колонии в чистую культуру – обособленность колонии от других колоний, отсутствие в чашке воздушного грибного мицелия. Затем, среди колоний, удовлетворяющих перечисленным условиям, отбирались морфологически отличающиеся для повышения вероятности получения культур, относящихся к разным видам. При отборе учитывались следующие морфологические признаки:

- размер колонии;
- форма колонии;
- поверхность колоний;
- цвет воздушного мицелия;
- цвет субстратного мицелия;

Выбранные колонии отбирались в пробирки с 3 мл стерильной дистиллированной воды. Каждая суспензия высевалась в три чашки Петри: на среду Гаузе 1 путем точечного нанесения суспензии вокруг диска с нистатином, на среду Гаузе 1 методом желобка и на среду Сабуро. При посеве методом желобка в застывшей среде стерильным скальпелем вырезался желобок шириной 7 мм на всю глубину среды. Края желобка засеивались культурой из приготовленной суспензии, после чего сверху желобка помещались два покровных стекла. При инкубировании на покровных стеклах происходил рост колоний.

Засеянные чашки Петри помещались в плотно закрытый пластиковый контейнер. Инкубирование проводилось в течение 7 дней при температуре  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Через 7 дней культуры, для которых был зафиксирован рост на среде Сабуро, отбраковывались. Для остальных культур проводилась микроскопия колоний на покровных стеклах при увеличении в 100 и 1 000 крат. При микроскопии оценивалось наличие мицелия, толщина гиф мицелия, наличие спораносцев. При наличии характерных для актиномицетов морфологических признаков на чашку с

посевом вокруг дисков с нистатином наносилась маркировка с присвоенным номером штамма, чашка помещалась в плотно закрытый контейнер, который хранился в холодильнике при температуре  $+3\pm 1^\circ\text{C}$ .

Каждый штамм актиномицетов из полученных чистых культур высевался методом газона на 7 твердых питательных сред: Гаузе 1 (среда 1), овсяный агар (среда 2), глицерин-нитратный агар (среда 3), Гаузе 2 (среда 4), пептонно-дрожжевой агар (среда 5), агаризованный LB бульон (среда 6), мясо-пептонный агар (среда 7). Среды 1 и 3 являются минеральными, среды 2,4,5,6,7 – органическими. Состав выбранных сред различен по источникам и количеству азота и углерода, составу и количеству микро- и макроэлементов. Рецепты сред 1-5 взяты из определителя актиномицетов Г.Ф. Гаузе [9]. Рецепты приведены в приложении 1. Среды 6 и 7 являются готовыми средами. Контроль кислотности сред проводился с помощью РН-метра. Засеянные чашки Петри помещались в плотно закрытый контейнер и инкубировались при температуре  $27\pm 1^\circ\text{C}$  в течение 10 дней.

Для определения продуцирования антибиотиков выделенными штаммами актиномицетов тестовые виды бактерий высевались на среду АГВ методом газона. Суспензия бактерий для посева готовилась внесением в раствор натрия хлорида 0,9% 24-х часовых колоний в количестве, позволяющим получить мутность суспензии, соответствующую стандарту мутности МакФарланда 0,5. В центр каждой чашки помещался цилиндр с культурой актиномицета (метод агаровых блоков), который с помощью стерильной пробирки вырезался из среды, на которой проводилось его культивирование. Дополнительно для каждого вида тестовых бактерий заседалась контрольная чашка с помещенным в нее диском с ампициллином. Таким образом, для каждого тестового вида бактерий проводился посев в 8 чашек Петри – 7 с цилиндрами, вырезанными из 7 сред со штаммом актиномицета, и одну контрольную с диском ампициллина. Чашки инкубировались при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 24 часов. Для оценки результата проводилось измерение диаметра зоны ингибирования роста бактерий вокруг диска (бактерицидный эффект) или задержки роста (бактериостатический эффект). Считалось, что бактерицидный (бактериостатический) эффект присутствует, если диаметр зоны ингибирования/задержки роста составлял не менее 18 мм.

## Результаты и обсуждения

1. Выбор видов тестовых микроорганизмов, получение чистых культур и видовая идентификация

*Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* являются хорошо изученными микроорганизмами, часто используемыми в качестве тестовых видов бактерий при качественной проверке наличия антибиотиков в исследуемых вторичных метаболитах, эффективных в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. При этом надо отметить, что *Bacillus subtilis* 534 является продуцентом ряда антибиотиков, что обуславливает у нее наличие генов резистентности к этим антибиотикам. *Kocuria varians* является частью нормальной микрофлоры кожи человека и млекопитающих, не является продуцентом антибиотиков и может быть

использована в качестве тестового микроорганизма, альтернативного часто используемому *Micrococcus luteus*.

Результаты выделения чистых культур *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* приведены в приложении 2 на фото 1 и 2, их микроскопия – в приложении 2 на фото 3 и 4.

Для идентификации чистой культуры микроорганизма, полученного из смыва с кожи (приложение 2, фото 5), была проведена микроскопия окрашенного по Граму препарата. При микроскопии видны грамположительные кокки, диаметром около 1 мкм, расположены поодиночке, попарно или в тетрадах (приложение 2, фото 6).

Родовая и видовая идентификация чистой культуры проводилась с помощью определителя Берджи [10] и данным The Bacterial Diversity Metadatabase [11]. По результатам микроскопии исследуемый микроорганизм относится к 17-ой группе – грамположительные кокки. Т.к. рост культуры получен в присутствии кислорода, то он является облигатным аэробом (подгруппа 17.1) или факультативным анаэробом (подгруппа 17.2).

Исходя из наличия ярко-желтого пигмента колоний чистой культуры и данных микроскопии исследуемый микроорганизм может относиться к одному из следующих видов: *Micrococcus luteus*, *Kocuria varians* (выведен из рода *Micrococcus* в 1999 г.) или *Staphylococcus aureus*. Для идентификации вида были проведены биохимические тесты. В таблице 2 показаны данные для *Micrococcus luteus*, *Kocuria varians* [11] и *Staphylococcus aureus* и результаты тестов для исследуемого микроорганизма.

Таблица 2. Результаты тестов исследуемых кокков в сравнении с данными по *Micrococcus luteus*, *Kocuria varians* и *Staphylococcus aureus*<sup>1</sup>

Тест	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Kocuria varians</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Исследуемый микроорганизм
- каталазу <sup>2</sup>	+ <sup>3</sup>	+	+	+
- галотолерантность	+	+	+	+
- оксидазу	+	-	-	-
- коагулазу	-	-	+	-
- ферментацию сахарозы	-	+	+	+
- ферментацию глюкозы	-	+	+	+
- чувствительность к новобицину	+	-	+/-	-
- чувствительность к бацитрацину	+	-	-	-

<sup>1</sup> Фото результатов тестов исследуемого микроорганизма приведены в Приложении 2, фото 7-11

<sup>2</sup> - В таблице использованы следующие обозначения:

«+» - тест положительный

«-» - тест отрицательный

«+/-» - результат зависит от штамма

Совокупность данных о морфологии колоний, микроскопии и результатов тестов позволяют сделать вывод о принадлежности исследуемой культуры к виду *Kocuria varians*.

## 2. Выделение актиномицетов из образцов почвы и получение чистых культур

Выбранный метод выделения актиномицетов из почвенных образцов позволил получить 28 чистых культур актиномицетов, имеющих различающуюся морфологию на среде Гаузе 1. Принадлежность выделенных чистых культур к порядку *Actinomycetales* определялась по морфологии колоний и данных микроскопии. При микроскопии оценивалась толщина мицелия, характерные возрастные изменения мицелия (фрагментация мицелия, утолщение гиф, наличие вакуолистой плазмы с зернами метакроматина), наличие спораносцев характерной формы. Описание морфологии колоний выделенных штаммов актиномицетов приведено в таблице 3, примеры фото колоний полученных чистых культур и их микроскопии приведены в приложении 3, фото 1-16<sup>1</sup>.

Таблица 3. Описание морфологии выделенных штаммов

Штамм	Описание морфологии
Штамм 1	Округлые колонии неправильной формы, диаметром 3,5 мм, слегка выступающие над поверхностью среды. Поверхность колоний плоская, мучнистая. Цвет воздушного мицелия грязно-серый, с белыми вкраплениями, цвет субстратного мицелия белый.
Штамм 2	Круглые колонии, диаметром 3 мм, выпуклые. Поверхность колоний бархатная. Цвет воздушного мицелия белый, цвет субстратного мицелия белый.
Штамм 3	Круглые колонии, диаметром 3,5 мм, слегка выступающие над средой. Поверхность колоний неровная, плоская, мучнистая. Цвет воздушного мицелия серый с белым налетом в центре и по краям, цвет субстратного мицелия серый.
Штамм 4	Округлые колонии неправильной формы, диаметром 2,5 мм, плоские, слегка приподнятые над средой. Поверхность колоний неровная, плоская. Цвет воздушного мицелия бежевый, цвет субстратного мицелия грязно-серый.
Штамм 5	Округлые колонии неправильной формы, диаметром 3 мм, плоские, слегка бугристые. Поверхность мучнистая. Цвет воздушного мицелия бежевый, с белыми вкраплениями, цвет субстратного мицелия серо-бежевый.

<sup>1</sup> В ходе выполнения работы автором сделано более 2 000 фотографий. Часть из них оформлены в фотоальбом, который может быть представлен автором.

Штамм	Описание морфологии
Штамм 6	Круглые колонии, диаметром 4 мм, сильно выступающие. Поверхность колоний бугристая, бархатная. Воздушный мицелий темно-серого цвета, субстратный мицелий белый.
Штамм 7	Круглые колонии, диаметром 2,5 мм, слегка выступающие над средой. Поверхность колоний слегка неровная, бархатная. Цвет воздушного мицелия серый, субстратного мицелия светло-серый.
Штамм 8	Круглые колонии, диаметром 3 мм, плоские. Поверхность мучнистая, край колоний приподнят. Цвет воздушного мицелия грязно-серый с белой каймой. Цвет субстратного мицелия белый.
Штамм 9	Колонии неправильной формы, в диаметре 3 мм, плоские. Поверхность гладкая, матовая. Цвет воздушного мицелия желтый, цвет субстратного мицелия белый.
Штамм 10	Круглые колонии, диаметром 4 мм, плоские. Поверхность пушистая. Цвет воздушного мицелия светло-серый, цвет субстратного мицелия светло-серый.
Штамм 11	Округлые колонии неправильной формы, диаметром 3,5 мм. Поверхность слегка бугристая, мучнистая. Цвет воздушного мицелия белый со светло-серыми бугорками. Цвет субстратного мицелия белый.
Штамм 12	Колонии неправильной формы, максимальный размер в одном направлении составляет 4 мм. Поверхность бугристая, с куполообразными выступами, мучнистая. Воздушный мицелий темно-серого цвета, куполообразные выступы белого цвета. Субстратный мицелий белого цвета.
Штамм 13	Круглые колонии, диаметром 2,5 мм. Поверхность колоний плоская с куполообразным выступом в центре, плоские участки гладкие, купол мучнистый. Воздушный мицелий светло-серого цвета, на куполе белого цвета. Субстратный мицелий серый.
Штамм 14	Круглые колонии, диаметром 1,5 мм. Поверхность плоская, гладкая в виде сухой корочки. Цвет воздушного мицелия от бежевого до темно-коричневого, цвет субстратного мицелия темно-коричневый.
Штамм 15	Круглые колонии, диаметром 4 мм, плоские, с приподнятым краем. Поверхность мучнистая. Цвет воздушного мицелия ярко-желтый, субстратного ярко-желтый.
Штамм 16	Круглые колонии, диаметром 1 мм, плоские, в виде корочки. Поверхность бархатная. Цвет воздушного мицелия коричневый в центре колонии, желтый по краям, цвет субстратного мицелия – грязно-желтый.
Штамм 17	Круглые колонии, диаметром до 3 мм, плоские. Поверхность бархатная. Цвет воздушного мицелия светло-серый, цвет субстратного мицелия светло-серый.
Штамм 18	Круглые колонии, диаметром 2,5 мм, плоские. Поверхность в виде сухой корочки. Цвет воздушного мицелия светло-коричневый со

Штамм	Описание морфологии
	светло-лиловым ободком, цвет субстратного мицелия светло-коричневый.
Штамм 19	Круглые колонии, диаметром 1,5 мм, плоские с приподнятым центром. Поверхность бархатная. Цвет воздушного мицелия в центре темно-розовый, по краям белый, цвет субстратного мицелия белый.
Штамм 20	Круглые колонии, диаметром 2 мм, плоские. Поверхность бархатная. Воздушный мицелий ярко-красный, субстратный мицелий ярко-красный.
Штамм 21	Округлые колонии неправильной формы, до 3,5 мм в диаметре с волнистым краем, плоские. Поверхность слегка блестящая. Цвет воздушного мицелия неоново-желтый, по краям светло-желтый. Цвет субстратного мицелия светло-желтый.
Штамм 22	Округлые колонии, диаметром до 4 мм, выпуклые. Поверхность мучнистая. Воздушный мицелий от белого до кремового цвета, цвет субстратного мицелия желтый.
Штамм 23	Круглые колонии, диаметром 3,5 мм, плоские. Поверхность бархатная. Цвет воздушного мицелия серый, субстратного – серый.
Штамм 24	Круглые колонии, диаметром 3,5 мм, плоские. Поверхность в виде слегка бугристой сухой корочки. Цвет воздушного мицелия красный, по краям розовый, цвет субстратного мицелия красный.
Штамм 25	Круглые колонии, диаметром 4 мм, слегка выпуклые, край приподнятый. Поверхность пушистая. Цвет воздушного мицелия в центре колоний светло-серый, кайма темно-серая. Субстратный мицелий болотно-серый, темный.
Штамм 26	Округлые колонии неправильной формы, с изрезанным краем, сильно выпуклые, диаметром от 2 до 4 мм. Поверхность мучнистая. Цвет воздушного мицелия белый с темно-серой каймой, цвет субстратного мицелия темно-серый (почти черный).
Штамм 27	Круглые колонии с изрезанным краем, слегка выпуклые, диаметром 3-3,5 мм. Поверхность сильно бугристая, бархатная. Цвет воздушного мицелия грязно белый, бугорки от кремовых до светло-серых. Цвет субстратного мицелия желто-бежевый.
Штамм 28	Круглые колонии с волнистым краем, выпуклые, диаметром 4 мм. Поверхность пушистая. Цвет воздушного мицелия темно-коричневый, ободок по краю кремовый. Цвет субстратного мицелия грязно-зеленый.

3. Выбор сред культивирования выделенных актиномицетов и метода оценки результатов воздействия вторичных метаболитов выделенных штаммов актиномицетов на культуры *Bacillus subtilis*, *Kocuria varians*, *Escherichia coli*

На всех выбранных средах выделенные штаммы актиномицетов образовали колонии, отличающиеся по следующим основным морфологическим признакам:

- Различное развитие воздушного мицелия, в т.ч. в виде бархатного, пушистого или мучнистого налета, в виде тонкой пленки, в виде корочки различной толщины с различным рельефом поверхности (гладкая, бугристая, сморщенная, с выступами), в виде гладких слизистых колоний, лысые колонии (отсутствие воздушного мицелия).
- Различная пигментация воздушного мицелия.
- Различающийся по цвету водорастворимый пигмент или его отсутствие.
- Разная степень развития воздушного мицелия.

Различие морфологии колоний одного и того же штамма по данным признакам говорит об изменении биохимической деятельности культуры, и, значит, о возможном изменении наличия, концентрации или состава веществ с антибиотическими свойствами.

Примеры морфологии колоний на разных средах приведены в приложении 3, фото 16-30.

#### 4. Проверка продуцирования антибиотиков выделенными штаммами актиномицетов

Из 28 выделенных штаммов актиномицетов продуцирование антибиотиков зафиксировано у 78,5 % штаммов (22 штамма) – выявлен бактерицидный или бактериостатический эффект, как минимум, на одной из семи сред по отношению хотя бы к одному из тестовых микроорганизмов. Максимальное количество штаммов продуцировало антибиотики на овсяном агаре (82%), минимальное – на мясо-пептонном агаре (14%) (приложение 3, диаграмма 1). В таблице 4 представлена информация по штаммам, продуцировавшим антибиотики.

Таблица 4. Продуцирование антибиотиков по средам

	Среда 1	Среда 2	Среда 3	Среда 4	Среда 5	Среда 6	Среда 7	Итого
Штамм 1	- <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	6
Штамм 2	+	-	-	-	-	-	-	1
Штамм 3	+	-	-	+	+	-	-	3
Штамм 5	+	+	-	+	-	-	-	3
Штамм 8	+	+	+	-	+	+	-	5
Штамм 9	-	+	-	-	+	+	-	3
Штамм 10	+	+	-	-	-	-	-	2
Штамм 11	-	+	+	-	-	-	+	3
Штамм 12	-	+	+	-	-	+	-	3
Штамм 13	-	+	-	-	-	-	-	1
Штамм 14	-	+	-	+	+	-	-	3
Штамм 15	-	+	+	-	-	+	-	3
Штамм 16	-	+	-	-	-	-	-	1
Штамм 17	+	-	-	-	+	-	-	2
Штамм 18	-	+	-	-	+	-	+	3
Штамм 19	+	+	+	-	-	-	-	3
Штамм 20	-	+	-	-	-	-	-	1
Штамм 21	-	+	-	-	-	-	-	1

	Среда 1	Среда 2	Среда 3	Среда 4	Среда 5	Среда 6	Среда 7	Итого
Штамм 22	-	+	-	-	-	+	-	2
Штамм 24	-	+	-	-	-	-	-	1
Штамм 25	+	-	+	+	+	+	-	5
Штамм 26	-	+	+	-	+	-	-	3

<sup>1</sup> – В таблице использованы следующие обозначения:

«+» - штамм продуцировал антибиотики на среде

«-» - штамм не продуцировал антибиотики на среде

В колонке «Итого» представлено количество сред, на котором штамм продуцировал антибиотики.

Из 22 штаммов, у которых было зафиксировано продуцирование антибиотиков, 4 штамма не продуцировали антибиотики на овсяном агаре, при этом все 4 штамма продуцировали антибиотики на среде Гаузе 1, дополнительно 3 штамма - на пептонно-дрожжевом агаре, 2 – на среде Гаузе 2, и по одному – на глицерин нитратном агаре и агаризованном LB бульоне.

16 штаммов (73%) продуцировали антибиотики на двух и более средах, 12 штаммов (54,5%) на трех и более средах (приложение 3, диаграмма 2).

Разные штаммы продуцировали антибиотики на разном наборе сред (приложение 3, диаграммы 1, 3), при этом 14 штаммов продуцировали разные антибиотики (или их разное количество) на разных средах, в т.ч. эффективные по отношению к разным видам грамположительных и/или грамотрицательным бактериям (таблица 5).

Таблица 5. Штаммы, продуцировавшие разные антибиотики (разное количество) на разных средах

	Гаузе 1	Овсяный агар	Глицерин-нитратный агар	Гаузе 2	Пептонно-дрожжевой агар	Агаризованный LB бульон	Мясо-пептонный агар
Штамм 1 <sup>1</sup>		BS <sup>2</sup>	BS	BS,KV	BS,KV	BS,KV	BS,KV
Штамм 5	BS,KV	BS,KV,EC		BS,KV,EC			
Штамм 8	KV	BS,KV	KV		BS,EC	BS,KV	
Штамм 9		BS,KV,EC			BS	BS,KV	
Штамм 10	BS	BS,KV,EC					
Штамм 11		KV,EC	BS				KV
Штамм 12		EC	BS,KV			BS,EC	
Штамм 15		BS	KV			BS,KV	
Штамм 17	KV,EC				BS		
Штамм 18		BS,KV,EC			BS		KV
Штамм 19	KV	BS,KV,EC	KV				
Штамм 22		KV,EC				BS	
Штамм 25	BS,KV		BS,KV	BS,KV	KV	KV	
Штамм 26		BS	BS		KV		

<sup>1</sup> – в ячейках перечислены виды тестовых бактерий, по отношению к которым обнаружено действие антибиотика, продуцированного штаммом актиномицета на указанной среде. Пустая ячейка означает, что для конкретного штамма на указанной среде действие антибиотика не выявлено.

<sup>2</sup> – в таблице приняты следующие обозначения:

BS – *Bacillus subtilis*, KV – *Kocuria varians*, EC – *Escherichia coli*.

Количество штаммов, продуцировавших антибиотики, эффективные по отношению к грамотрицательным или грамположительным тестовым микроорганизмам, различно на разных средах (приложение 3, диаграмма 4).

Информация о зоне ингибирования/задержки роста по штаммам в разрезе сред и тестовых видов бактерий представлена в таблице 6.

Примеры результатов посевов представлены в приложении 3 фото 31-39.

Таблица 6. Результат действия вторичных метаболитов штаммов с антибактериальной активностью

Штамм/Среда	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Kocuria varians</i>	<i>Escherichia coli</i>
Штамм 1			
Овсяный агар	25 <sup>1</sup>	15	0
Глицерин-нитратный агар	20	10	0
Гаузе-2 твердая	25	20	0
Пептонно-дрожжевой агар	25	20	0
LB бульон агаризованный	25	20	0
Мясо-пептонный агар	25	18	0
Штамм 2			
Гаузе 1	20	18	0
Штамм 3			
Гаузе 1	20	20	0
Пептонно-дрожжевой агар	18	18	0
Штамм 5			
Гаузе 1	25	25	0
Овсяный агар	30	20	30*
Гаузе 2	25	25*	25*
Штамм 8			
Гаузе 1	15*	18	0
Овсяный агар	35*	22	15
Глицерин-нитратный агар		35*	0
Пептонно-дрожжевой агар	35*	15	20
LB бульон агаризованный	35*	43*	0
Штамм 9			
Овсяный агар	35	18	30
Пептонно-дрожжевой агар	20	0	0
LB бульон агаризованный	25	20	0
Штамм 10			
Гаузе 1	35	0	0
Овсяный агар	20	20	35
Штамм 11			
Овсяный агар	15	18	18
Глицерин-нитратный агар	20	0	0

Штамм/Среда	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Kocuria varians</i>	<i>Escherichia coli</i>
Мясо-пептонный агар	0	18	0
Штамм 12			
Овсяный агар	0	16	18*
Глицерин-нитратный агар	30*	25*	0
LB бульон агаризованный	19	0	30*
Штамм 13			
Овсяный агар	0	38	25
Штамм 14			
Овсяный агар	20	23	0
Гаузе 2	55*	55*	0
Пептонно-дрожжевой агар	28	25*	0
Штамм 15			
Овсяный агар	45	0	0
Глицерин-нитратный агар	0	40*	0
LB бульон агаризованный	20	23	0
Штамм 16			
Овсяный агар	35	25	18
Штамм 17			
Гаузе 1	0	30	18
Пептонно-дрожжевой агар	35	0	0
Штамм 18			
Овсяный агар	18	30	18
Пептонно-дрожжевой агар	40*	0	0
Мясо-пептонный агар	0	23	0
Штамм 19			
Гаузе 1	0	18	0
Овсяный агар	18	20	23
Глицерин-нитратный агар	0	18	0
Штамм 20			
Овсяный агар	0	0	25
Штамм 21			
Овсяный агар	0	25	0
Штамм 22			
Овсяный агар	0	35	25
LB бульон агаризованный	20	0	0
Штамм 24			
Овсяный агар	40	30	0
Штамм 25			
Гаузе 1	20	20	0
Глицерин-нитратный агар	50*	23	0
Гаузе 2	18	21	0
Пептонно-дрожжевой агар	0	18	0
LB бульон агаризованный	0	20	0
Штамм 26			
Овсяный агар	38	0	0
Глицерин-нитратный агар	23	0	0
Пептонно-дрожжевой агар	0	40	0

<sup>1</sup> – в ячейках указан диаметр зоны ингибирования/задержки роста в мм; звездочка рядом с числом в ячейке означает бактериостатический эффект, значение без звездочки – бактерицидный эффект.

В данной работе под термином «продуцирование антибиотиков» имеется ввиду антагонистическая активность метаболитов штаммов актиномицетов по отношению к тестовым штаммам микроорганизмов. Согласно данным литературы, эта активность у актиномицетов чаще всего обусловлена выделением антибиотиков для подавления роста конкурентных микроорганизмов, но может быть связана и с иным действием отдельного метаболита или их комплекса.

Полученные результаты показывают, что разные штаммы актиномицетов могут значительно отличаться по способности продуцирования антибиотиков в зависимости от среды культивирования. Можно отметить высокую эффективность продуцирования антибиотиков, оказывающим бактерицидные (бактериостатические) воздействие на все виды тестовых микроорганизмов, на овсяном агаре (приложение 3, диаграмма 3, среда 2). Овсяный агар является самой богатой из используемых сред с точки зрения наличия в ней микро-и макроэлементов, аминокислот, витаминов. Все без исключения штаммы сформировали на данной среде обильный воздушный мицелий, формирование воздушного мицелия происходило быстрее, чем на других средах. Таким образом, возможно, наступление фазы развития колоний, на которой начинается выработка вторичных метаболитов, наступала на данной среде на более раннем сроке культивирования, что, в конечно итоге, приводило к более высокой концентрации биологически-активных веществ. В пользу данного предположения говорит то, что второй по эффективности средой является пептонно-дрожжевой агар, который из используемых сред наиболее близок к овсяному агару. Воздушный мицелий на пептонно-дрожжевом агаре во всех случаях не является настолько хорошо развитым, как на овсяном агаре, и формировался позже.

С точки зрения степени и скорости развития воздушного мицелия наиболее близкий к овсяному агару результат был получен на среде Гаузе 1. Во всей видимости, основным компонентом среды, влияющим на данный фактор, является крахмал, содержащийся в двух из использованных сред – Гаузе 1 и овсяном агаре. Данное предположение подтверждается фактом, что обильный воздушный мицелий большое количество видов актиномицетов формируют, например, при выращивании на ломтиках картофеля, также богатых крахмалом.

На средах Гаузе 2, агаризованном LB бульоне и мясо-пептонном агаре большинство штаммов формировали слабо-развитый воздушный мицелий, на мясо-пептонном агаре в течение времени культивирования для некоторых штаммов отмечалось постепенное уплотнение воздушного мицелия с перерождением его в тонкую пленку. Данная особенность отмечается также Н.А. Красильниковым [5].

А.А. Прокофьева-Бельговская отмечает зависимость продуцирования антибиотиков от подавления образования спорообразующих гиф на хорошо развитом воздушном мицелии, на которое влияет используемый в среде источник азота [6].

В то же время необходимо отметить, что хорошее развитие воздушного мицелия не является необходимым условием для продуцирования антибиотиков.

Так, например, штаммы 15 и 19 продуцировали антибиотики на глицерин-нитратном агаре, сформировав на нем лысые колонии (пример колоний штамма 19 приложение 3, фото 26). Глицерин, который служит в данной среде источником углерода, считается легко усваиваемым большинством видов актиномицетов, и, возможно, в этом случае запускает биохимическую деятельность культуры по пути выработки вторичных метаболитов. На среде Гаузе 1 несмотря на хорошее развитие воздушного мицелия продуцирование антибиотиков зафиксировано только у 36% выделенных штаммов.

Подбор состава среды индивидуально для каждого штамма возможно позволит обнаружить новые биологически активные вещества для давно известных штаммов актиномицетов. Также можно предположить, что при индивидуальном подборе среды, продуцировать антибиотики может любой штамм актиномицетов.

### Выводы

1. В качестве тестовых видов микроорганизмов выбраны *Bacillus subtilis*, *Kocuria varians*, *Escherichia coli*. Получена чистая культура *Kocuria varians*, проведена видовая идентификация с использованием микроскопии и биохимических тестов.
2. Получены чистые культуры 28-ми штаммов актиномицетов, имеющих отличающуюся морфологию колоний на среде Гаузе 1.
3. В качестве метода оценки результатов воздействия вторичных метаболитов выделенных штаммов актиномицетов на культуры *Bacillus subtilis*, *Kocuria varians*, *Escherichia coli* использован метод агаровых блоков с 7-ми разных сред, на которых проводилось культивирование выделенных штаммов актиномицетов.
4. Продуцирование антибиотиков зафиксировано у 78,5 % штаммов, разные штаммы продуцировали антибиотики на разных средах.

### Заключение

Состав питательных сред является одним из факторов, прямо влияющим на продуцирование антибиотиков. Овсяный агар является средой, оказавшейся наиболее эффективной для продуцирования антибиотиков, пептонно-дрожжевой агар, глицерин-нитратный агар и среда Гаузе 1 также показали высокую эффективность, что позволяет предложить использование данных сред в качестве стандартного набора для проверки продуцирования антибиотиков новыми выделяемыми штаммами.

Проведенное исследование будет продолжено автором. На втором этапе исследования планируется повторение проведенных экспериментов с обработкой результатов принятыми статистическими методами, а также проведение

экспериментов с модифицированными средами Гаузе 1, пептонно-дрожжевым агаром и глицерин-нитратным агаром. Также планируется выбор методики погруженного культивирования и сравнение особенностей сред при культивировании на твердых и жидких средах.

### Литература

1. Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н. Стрептомицеты в свете концепции «многоклеточности» бактерий. Антибиотики и химиотерапия 2016, том 61, № 7-8, с. 39-46
2. Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожевин П.А. Устойчивость организмов к антибиотикам: резистомы, ее объем, разнообразие и развитие. Антибиотики и химиотерапия 2013, том 58, № 5-6, с. 38-38
3. Сергеева А.Г., Куимова Н.Г. Актиномицеты как продуценты биологически активных веществ. Бюллетень физиологии и патологии дыхания 2006, № S22, с. 88-90
4. Зенова Г.М. Почвенные актиномицеты, Учебное издание, Издательство Московского университета, 1992, 77
5. Красильников Н.А. Актиномицеты – антагонисты и антибиотические вещества, монография, Москва, Издательство Академии наук СССР 1950, 300
6. Прокофьева-Бельговская А.А. Строение и развитие актиномицетов, монография, Москва, Издательство Академии наук СССР 1963, 221
7. Филиппова Н.С., Виноградова К.А. Программируемая клеточная смерть как одна из стадий дифференцировки стрептомицетов. Микробиология 2017, том 86 №4, с. 421-438
8. Синёва О.Н., Терехова Л.П. Направленное выделение актиномицетов редких родов из почвы. Антибиотики и химиотерапия, 2015, том 60, № 7-8, с. 27-33
9. Г.Ф. Гаузе, Т.П. Преображенская, М.А. Свешникова, А.П. Терехова, Т.С. Максимова Определитель актиномицетов, Москва, Наука 1983, 250
10. Определитель бактерий Берджи. Том 2 под редакцией Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса, 9-ое издание в 2 томах, Москва, Мир, 1997
11. The Bacterial Diversity Metadatabase [электронный ресурс], Режим доступа <https://bacdive.dsmz.de/> (дата обращения: 25.05.2025)

## Приложение 1

### Гаузе 1 (Минеральный агар): 1

Крахмал водорастворимый – 20,0 г;  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,5 г;  
MgSO<sub>4</sub> – 0,5 г;  
KNO<sub>3</sub> – 1 г

NaCl – 0,5 г;  
FeSO<sub>4</sub> – 0,01 г;  
Агар – 20 г  
Вода дистиллированная – 1 л

pH = 7,2 – 7,4

### Овсяный агар: 2

Овсяные хлопья – 20,0 - 65 г;  
Агар – 20 г;  
Водопроводная вода – 1 л

pH = 7,2 – 7,4

### Глицерин-нитратный агар: 3

Глицерин – 30 г;  
NaNO<sub>3</sub> – 2 г;  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1 г;  
MgSO<sub>4</sub> – 0,5 г;

KCl – 0,5 г;  
Агар – 20 г;  
Вода дистиллированная – 1 л

pH = 7,2 – 7,4

### Гаузе 2 (Органический агар): 4

Бульон Хоттингера – 30 мл;  
Пептон – 5 г;  
NaCl – 5 г;

Глюкоза – 10 г;  
Агар – 20 г;  
Вода водопроводная – 1 л

pH = 7,2 – 7,4

### Пептонно-дрожжевой агар: 5

Пептон – 10 г;  
Дрожжевой экстракт – 1 г;  
Цитрат железа – 0,5 г;

Агар – 20-25 г;  
Дистиллированная вода – 1 л

pH = 7,2 – 7,4

## Приложение 2



Фото 1. Колонии *Bacillus subtilis* на агаризованном LB бульоне



Фото 2. Колонии *Escherichia coli* на среде Эндо

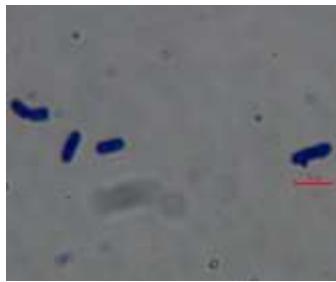


Фото 3. Микроскопия *Bacillus subtilis*



Фото 4. Микроскопия *Escherichia coli*



Фото 5. Чистая культура пигментированной колонии посева с кожи

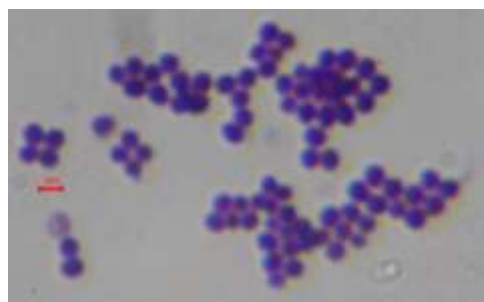


Фото 6. Микроскопия пигментированной колонии посева с кожи



Фото 7. Результат теста на оксидазу



Фото 8. Результат теста на ферментацию сахарозы



Фото 9. Результат теста на ферментацию глюкозы



Фото 10. Тест на чувствительность к новобицину



Фото 11. Тест на чувствительность к бацитрацину

## Приложение 3



Фото 1. Посев из почвенной суспензии. Обведены: 1-штамм 18, 2 – штамм 24



Фото 2. Чистая культура штамма 18

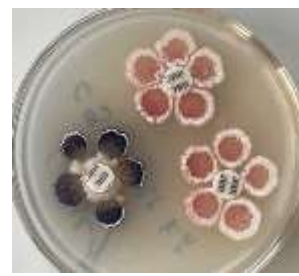


Фото 3. Чистая культура штамма 24. В колониях слева видно выделение капель жира и изменение морфологии штамма



Фото 4. Посев из почвенной суспензии. Обведены: 2-штамм 22, 4 – штамм 23. 1,3,5 не удалось выделить в чистую культуру



Фото 5. Чистая культура штамма 22



Фото 6. Чистая культура штамма 23



Фото 7. Штамм 9, микроскопия колонии на покровном стекле, увеличение 100 крат. Видны ветви длинных спороносцев с 1-2 завитками на конце



Фото 8. Штамм 9, микроскопия колонии на покровном стекле, увеличение 1 000 крат. Спороносец. Видно образование межклеточных перегородок



Фото 9. Штамм 9, микроскопия колонии на покровном стекле, увеличение 1 000 крат. Фрагментация мицелия

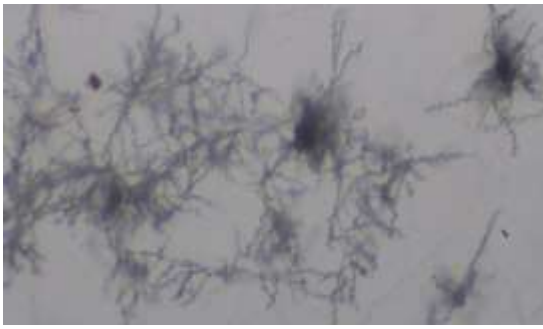


Фото 10. Штамм 11, микроскопия колонии на покровном стекле, увеличение 100 крат. Видны ветви спораносцев в виде длинных спиралей



Фото 11. Штамм 11, микроскопия колонии на покровном стекле, увеличение 1 000 крат. Спораносец



Фото 12. Штамм 11, микроскопия колонии на покровном стекле, увеличение 1 000 крат. Спораносец. Видно образование межклеточных перегородок

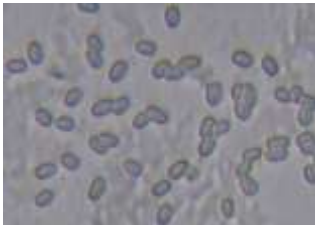


Фото 13. Штамм 9. Микроскопия колонии на покровном стекле, увеличение 1 000 крат. Отдельные вегетативные клетки

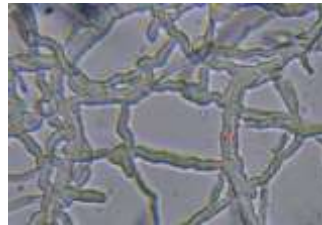


Фото 14. Штамм 19. Микроскопия колонии на покровном стекле, увеличение 1 000 крат. Утолщение воздушных гиф мицелия



Фото 15. Микроскопия колонии на покровном стекле, увеличение 1 000 крат. Прорастание споры

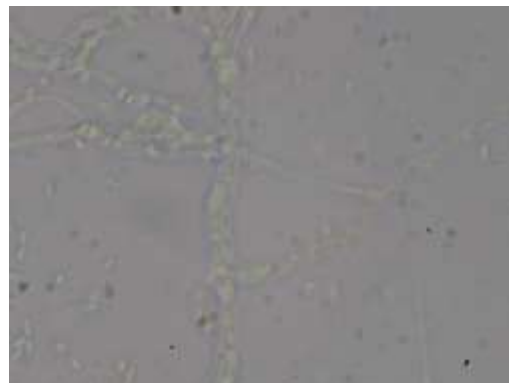


Фото 16. Микроскопия колонии на покровном стекле, увеличение 1 000 крат. Старый мицелий. Плазма вакуолистая с крупными зернами метакроматина.



Фото 17. Штамм 4 на среде Гаузе 1. Воздушный мицелий светло-серого цвета, хорошо развит в виде бархатного налета. Водорастворимы пигмент отсутствует.



Фото 18. Штамм 4 на овсяном агаре. Воздушный мицелий хорошо развит в виде пушистого налета серого цвета. Водорастворимы пигмент отсутствует.



Фото 19. Штамм 4 на глицерин-нитратном агаре. Воздушный мицелий в виде тонкой пленки кремового цвета. Водорастворимы пигмент отсутствует.



Фото 20. Штамм 4 на среде Гаузе 2. Воздушный мицелий в виде слегка слизистой пленки коричневого цвета. Присутствует водорастворимы пигмент коричневого цвета.



Фото 21. Штамм 4 на пептонно-дрожжевом агаре. Воздушный мицелий в виде бугристой корочки белого цвета, плохо развит. Присутствует темносиний водорастворимый пигмент.



Фото 22. Штамм 4 на агаризованном LB бульоне. Воздушный мицелий в виде корочки бежевого цвета, хорошо развит. Водорастворимый пигмент отсутствует.



Фото 23. Штамм 4 на мясо-пептонном агаре. Воздушный мицелий в виде корочки светло-коричневого цвета. Присутствует водорастворимый пигмент коричневого цвета.



Фото 24. Штамм 19 на среде Гаузе 1. Воздушный мицелий розового цвета хорошо развит в виде бархатной пленки. Присутствует розовый водорастворимый пигмент.



Фото 25. Штамм 19 на Овсяном агаре. Воздушный мицелий белого цвета хорошо развит в виде слизистой пленки. Водорастворимый пигмент отсутствует.



Фото 26. Штамм 19 на глицерин-нитратном агаре. Воздушный мицелий отсутствует (лысая колония). Субстратный мицелий розового цвета. Водорастворимый пигмент отсутствует.



Фото 27. Штамм 19 на среде Гаузе 2. Воздушный мицелий плохо развит в виде тонкой пленки белого цвета. Водорастворимый пигмент отсутствует.



Фото 28. Штамм 19 на пептонно-дрожжевом агаре. Воздушный мицелий желтого цвета в виде тонкой слизистой пленки, плохо развит. Присутствует водорастворимый пигмент желтого цвета.



Фото 29. Штамм 19 на агаризованном LB бульоне. Воздушный мицелий желтого цвета в виде тонкой слизистой пленки, хорошо развит. Водорастворимый пигмент отсутствует.



Фото 30. Штамм 19 на мясо-пептонном агаре. Воздушный мицелий хорошо развит в виде тонкой слизистой пленки коричневого и белого цвета. Присутствует водорастворимый пигмент коричневого цвета.



Фото 31. Пример контрольного посева *Bacillus subtilis*. В центр помещен диск с ампициллином



Фото 32. Пример действия вторичных метаболитов актиномицетов на рост *Bacillus subtilis*. Вторичные метаболиты штамма 2 на среде Гаузе 1



Фото 33. Пример действия вторичных метаболитов актиномицетов на рост *Bacillus subtilis*. Вторичные метаболиты штамма 14 на пептонно-дрожжевом агаре



Фото 34. Пример контрольного посева *Kosuria varians*. В центр помещен диск с ампициллином



Фото 35. Пример действия вторичных метаболитов актиномицетов на рост *Kosuria varians*. Вторичные метаболиты штамма 2 на среде Гаузе 1



Фото 36. Пример действия вторичных метаболитов актиномицетов на рост *Kosuria varians*. Вторичные метаболиты штамма 14 на пептонно-дрожжевом агаре



Фото 37. Пример контрольного посева *Escherichia coli*. В центр помещен диск с ампициллином

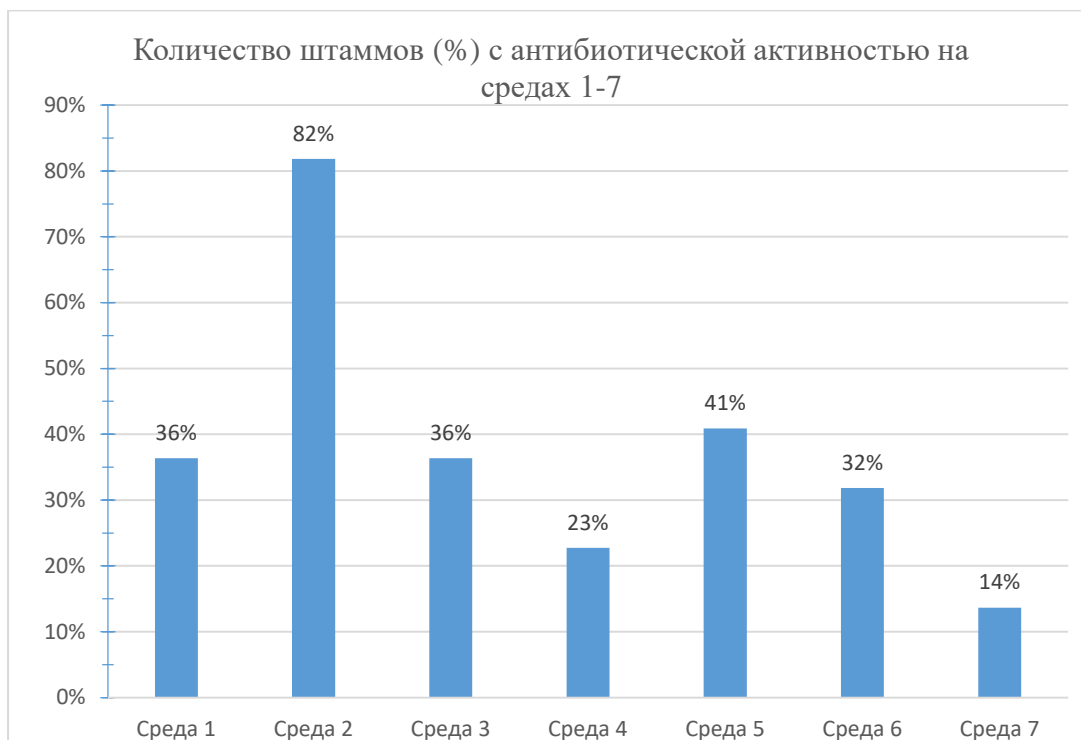


Фото 38. Пример действия вторичных метаболитов актиномицетов на рост *Escherichia coli*. Вторичные метаболиты штамма 9 на овсяном агаре



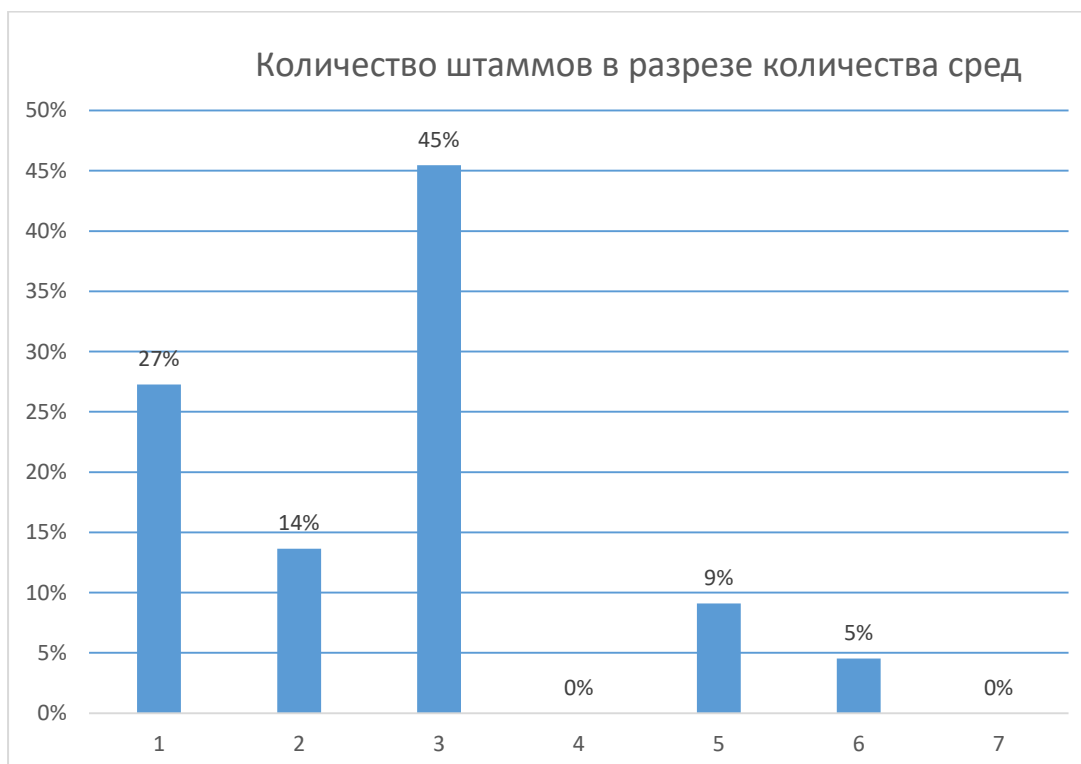
Фото 39. Пример действия вторичных метаболитов актиномицетов на рост *Escherichia coli*. Вторичные метаболиты штамма 9 на агаризованном LB бульоне

Диаграмма 1



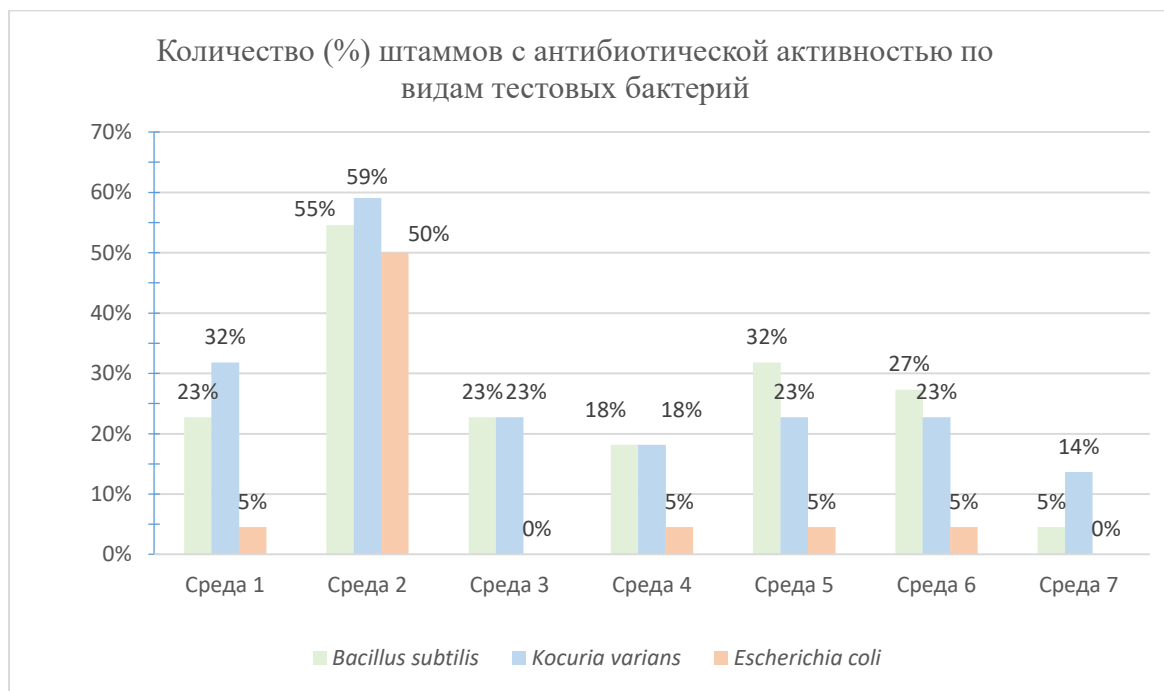
Среда 1 – Гаузе 1, Среда 2 – Овсяный агар, Среда 3 – Глицерин-нитратный агар, Среда 4 – Гаузе 2, Среда 5 – Пептонно-дрожжевой агар, Среда 6 – агаризованный LV бульон, Среда 7 мясо-пептонный агар

Диаграмма 2



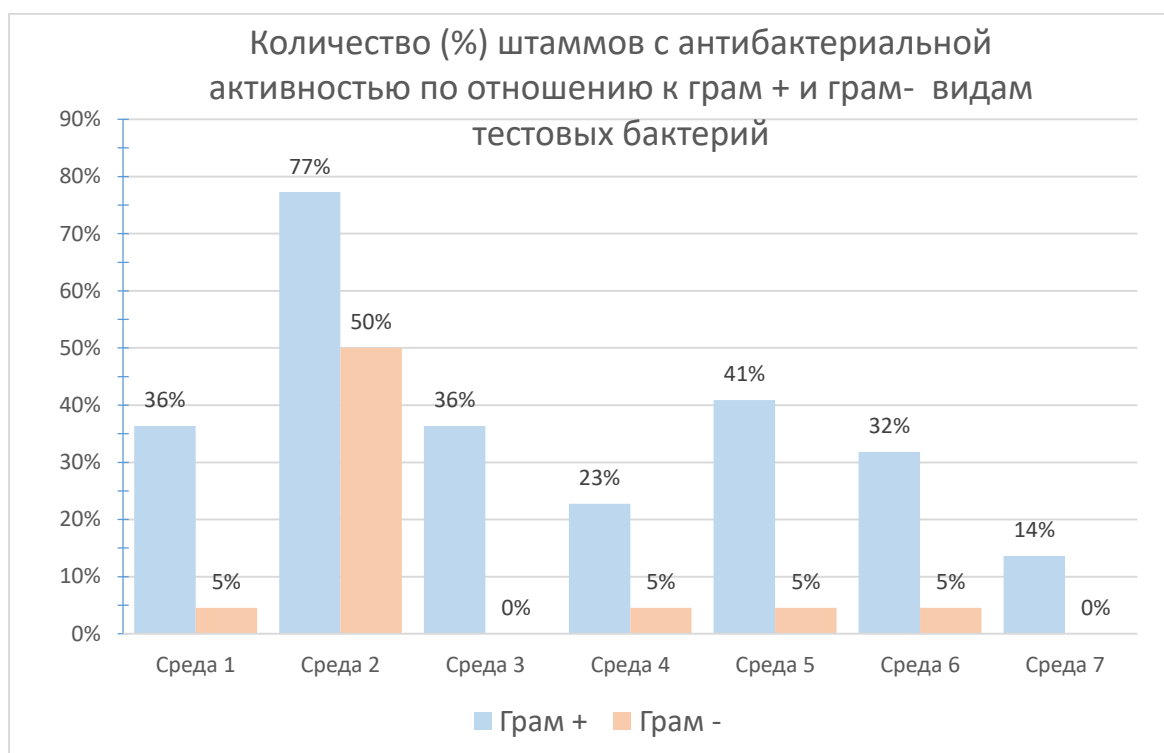
По вертикальной оси показано количество штаммов, продуцировавших антибиотики, по горизонтальной оси - количество сред, на которых продуцировались антибиотики. Например, только на одной среде антибиотики продуцировали 27% штаммов, на двух – 14% и т.д.

Диаграмма 3



Среда 1 – Гаузе 1, Среда 2 – Овсяный агар, Среда 3 – Глицерин-нитратный агар, Среда 4 – Гаузе 2, Среда 5 – Пептонно-дрожжевой агар, Среда 6 – агаризованный LV бульон, Среда 7 мясо-пептонный агар

Диаграмма 4



Среда 1 – Гаузе 1, Среда 2 – Овсяный агар, Среда 3 – Глицерин-нитратный агар, Среда 4 – Гаузе 2, Среда 5 – Пептонно-дрожжевой агар, Среда 6 – агаризованный LV бульон, Среда 7 мясо-пептонный агар